



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **07 JUIN 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES 30 AVR. 1997 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 97 05608 - DÉPARTEMENT DE DÉPÔT LY DATE DE DÉPÔT 30 AVR. 1997		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Marie-Pauline AYROLES Direction de la Propriété Intellectuelle PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins 58, avenue Leclerc 69007 LYON									
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°		n° du pouvoir permanent PG 04852 références du correspondant PM 97/006 téléphone 04 72 73 79 31 date									
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non											
Titre de l'invention (200 caractères maximum) Composition vaccinale anti-Helicobacter comprenant un adjuvant de type Th1.											
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 349505370 code APE-NAF 244C Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins S.A.		Forme juridique S.A.									
Nationalité (s) Française		Adresse (s) complète (s) 58, avenue Leclerc 69007 LYON Pays FRANCE									
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission											
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date 											
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire, n° d'inscription) AYROLES Marie-Pauline Responsable Propriété Intellectuelle		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION N. AMERIS									

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9705608

TITRE DE L'INVENTION :

Composition vaccinale anti-Helicobacter comprenant un adjuvant de type Th1.

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

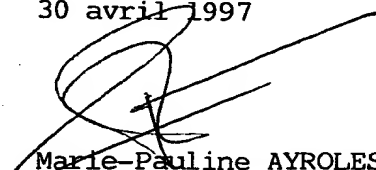
GUY Bruno
15B, rue des Noyers
69005 LYON (FR)

HAENSLER Jean
17, rue Piccandet
69290 Saint GENIS les OLLIERES (FR)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

30 avril 1997


Marie-Pauline AYROLES

La présente invention a pour objet l'usage particulier d'une préparation vaccinale destinée à induire chez un mammifère, une réponse immunitaire protectrice à l'encontre d'un organisme pathogène infectant des muqueuses, notamment à l'encontre des bactéries *Helicobacter*.

Helicobacter est un genre bactérien caractérisé par des bactéries spiralées à gram négatif. Plusieurs espèces colonisent le tractus gastrointestinal des mammifères. On cite en particulier *H. pylori*, *H. heilmanii*, *H. felis* et *H. mustelae*. Bien qu'*H. pylori* soit l'espèce la plus communément associée aux infections humaines, dans certains cas rares, *H. heilmanii* et *H. felis* ont pu être isolés chez l'homme. Une bactérie de type *Helicobacter*, *Gastrospirillum hominis* a également été décrite chez l'homme.

Helicobacter infecte plus de 50 % de la population adulte dans les pays développés et près de 100 % de celle des pays en voie de développement ; ce qui en fait un des agents infectieux prédominants au plan mondial.

H. pylori est retrouvée exclusivement à ce jour à la surface de la muqueuse de l'estomac chez l'homme et plus particulièrement autour des lésions de cratère des ulcères gastriques et duodénaux. Cette bactérie est à l'heure actuelle reconnue comme l'agent étiologique des gastrites antrales et apparaît comme un des cofacteurs requis pour le développement des ulcères. Par ailleurs, il semble que le développement des carcinomes gastriques puisse être associé à la présence d'*H. pylori*.

Il apparaît donc hautement souhaitable de mettre au point un vaccin en vue de prévenir ou de traiter les infections à *Helicobacter*.

A ce jour, plusieurs protéines d'*Helicobacter* ont déjà été proposées comme antigène vaccinal et la méthode de vaccination qui est couramment préconisée consiste à délivrer l'antigène au niveau de la muqueuse gastrique, c'est-à-dire à l'endroit même où la réponse immune est souhaitée. Pour ce faire, l'administration par voie orale a donc été retenue.

Toujours dans le même but (induction d'une réponse immunitaire au niveau de l'estomac), il a été proposé plus récemment, de délivrer l'antigène en un site muqueux autre que la muqueuse gastrique ; tel que par exemple la muqueuse nasale ou rectale

(WO 96/31235). Des lymphocytes stimulés par l'antigène en un territoire muqueux dit inducteur peuvent migrer et circuler de manière sélective pour aller induire une réponse immunitaire en d'autres territoires muqueux, dits effecteurs.

- 5 Une variante de ces méthodes consiste à effectuer une primo-immunisation par voie systémique avant d'administrer l'antigène par voie nasale.

Pour administration par voie muqueuse, l'antigène, le plus souvent un lysat bactérien ou une protéine purifiée, est associé à un adjuvant approprié comme la
10 toxine cholérique (CT) ou la heat-labile toxine (LT) d'*E. coli*.

Lorsque l'administration par voie muqueuse est mise en oeuvre, la réponse humorale que l'on observe, est de manière prédominante de type IgA. Ceci indique bien qu'il y a eu une réponse immunitaire locale.

15

Certains auteurs ont pensé très tôt qu'il existait une bonne corrélation entre une forte réponse de type IgA et un effet protecteur (Czinn et al, Vaccine (1993) 11 : 637). D'autres ont émis un avis plus réservé (Bogstedt et al, Clin. Exp. Immunol. (1996) 105 : 202). Bien qu'il n'existe pas à ce jour de véritable certitude concernant
20 ce sujet, l'induction d'anticorps qui soient notamment de type IgA, apparaît quoi qu'il en soit souhaitable pour la plupart des auteurs.

De manière générale, l'apparition des IgA témoigne de la mise en oeuvre d'une réponse de la part des lymphocytes T-helper de type 2 (réponse Th2).

25

En effet, la stimulation des lymphocytes T-helper par un antigène particulier permet d'obtenir différentes sous-populations de cellules T-helper, caractérisées par des profils de synthèse de cytokines différents.

30 Les cellules Th1 produisent notamment de manière sélective l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron- γ (IFN- γ), tandis que les cellules Th2 sécrètent de préférence l'IL-4, -5, et -10. En raison de leur production différenciée de cytokines, ces deux types de cellules T-helper ont des rôles distincts : les cellules Th1 favorisent l'immunité à médiation cellulaire *i.a.* une réponse de type inflammatoire, tandis que
35 les cellules Th2 stimulent la réponse humorale de type IgA, IgE et de certaines sous-classes d'IgG. On sait aussi que les cytokines produites par des cellules Th1 de souris

peuvent stimuler la réponse anticorps et en particulier que l'IFN- γ induit une réponse IgG2a.

5 Ainsi, des différentes études de l'art antérieur, émerge l'opinion selon laquelle l'induction d'une réponse Th2 caractérisée par l'apparition d'IgA est indispensable, sinon suffisante, afin d'obtenir un effet protecteur.

10 De manière surprenante, on a maintenant découvert que, même si une réponse Th2 ne nuit pas, il est aussi nécessaire d'induire une forte réponse Th1. En effet, des résultats expérimentaux démontrent maintenant qu'un effet protecteur peut être corrélé plus aisément avec une réponse Th1 qu'avec une réponse Th2.

15 Contrairement à ce qui était initialement recherché (D'Elis et al, J. Immunol. (1997) 158 : 962), la présente demande révèle donc l'importance d'induire une réponse Th1 de type inflammatoire au moment de l'immunisation, sans laquelle on ne peut observer d'effet protecteur.

20 On peut parvenir à induire une réponse Th1 à l'encontre d'*Helicobacter* en jouant sur un certain nombre de facteurs, comme par exemple le type d'adjuvant. On a en effet mis en évidence qu'en utilisant certains adjuvants on peut obtenir un taux de protection similaire ou supérieur à celui observé lorsque l'on utilise la voie muqueuse et des adjuvants tels que les toxines bactériennes.

25 En conséquence, la présente invention a pour objet :

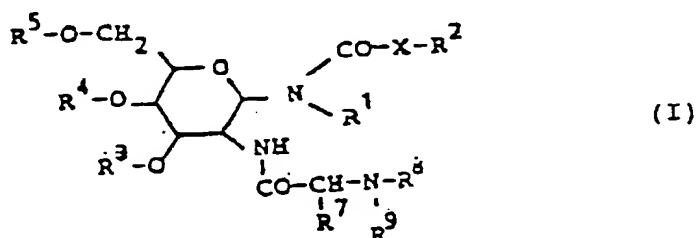
(a) L'usage conjoint d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*, dans la fabrication d'un médicament destiné à être administrée par voie systémique pour prévenir ou traiter une infection à *Helicobacter*.

30 (b) Une composition pharmaceutique qui comprend un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et au moins un composé (capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*) sélectionné parmi :

35 (i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;

(ii) des lipides cationiques qui sont des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et ont une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires ; et

(iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle :

R^1 représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone, de préférence 1 à 20 atomes de carbone,

X représente $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$ ou $-\text{NH}-$,

R^2 représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone, de préférence 1 à 20 atomes de carbone,

R^3 , R^4 et R^5 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl- CO-R^6 , dans lequel R^6 représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,

R^7 représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_7$, hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle, carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-imidazolylméthyle,

- R⁸ représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- 5 R⁹ représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et
- 10 R⁷ et R⁸ peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe -CH₂-CH₂-CH₂-.
- (c) L'usage d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins un composé sélectionné parmi les composés (i) à (iii) cités ci dessus, dans la fabrication d'une composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter* ; et
- 15 (d) Une méthode pour prévenir ou traiter une infection promue par un microorganisme capable d'infecter la muqueuse gastro-duodénale d'un mammifère *e.g.*, une infection à *Helicobacter*, selon laquelle on administre au mammifère par voie systémique, en une ou plusieurs fois, une composition
- 20 contenant au moins un agent immunogène dérivé dudit microorganisme *e.g.* d'*Helicobacter* et au moins un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre *e.g.*, d'*Helicobacter*.
- 25 (e) Une méthode pour prévenir ou traiter une infection promue par un microorganisme capable d'infecter la muqueuse gastro-duodénale d'un mammifère *e.g.*, une infection à *Helicobacter*, selon laquelle on administre au mammifère, en une ou plusieurs fois, une composition contenant au moins un agent immunogène dérivé dudit microorganisme *e.g.* d'*Helicobacter* et au moins un composé sélectionné parmi les composés (i) à (iii) cités ci dessus, et
- 30 par laquelle une réponse immunitaire de type Th1 est induite à l'encontre *e.g.* d'*Helicobacter*.

On peut mettre en évidence l'induction d'une réponse Th1 utile aux fins de la présente invention en estimant l'importance relative de la réponse Th1 par rapport à

35 la réponse Th2, en comparant par exemple les taux d'IgG2a et d'IgG1 induits chez la souris à l'encontre d'*Helicobacter*, qui témoignent respectivement de la mise en oeuvre des réponses Th1 et Th2. En effet, la réponse Th1 que l'on recherche est

généralement accompagnée d'une réponse Th2. Néanmoins, on considère que la réponse Th2 ne doit pas être significativement prédominante par rapport à la réponse Th1. Les taux d'IgG2a et d'IgG1 induits chez la souris peuvent être appréciés de manière conventionnelle à l'aide d'un test ELISA, à condition que les tests utilisés
5 pour chacun des deux sous isotypes soient de même sensibilité et en particulier que les anticorps anti-IgG2a et anti-IgG1 soient de même affinité.

Les quantités d'IgG2a et d'IgG1 peuvent être notamment mesurées à l'aide d'un test ELISA identique ou similaire à celui décrit ci-après. Les puits d'une plaque
10 ELISA en polycarbonate sont enduits avec 100 µl d'un extrait bactérien d'*Helicobacter e.g. H. pylori* à environ 10 µg/ml dans du tampon carbonate. La plaque ELISA est incubée 2 heures à 37°C puis une nuit à 4°C. La plaque est lavée avec du tampon PBS (phosphate buffer saline) contenant 0.05 % de Tween 20 (tampon PBS / Tween). Les puits sont saturés avec 250 µl de PBS contenant 1 % de
15 serum albumine bovine afin d'empêcher la liaison non-spécifique des anticorps. Après une heure d'incubation à 37°C, la plaque est lavée avec le tampon PBS / Tween. L'antisérum prélevé chez la souris, un certain nombre de jours après que cette dernière ait reçu la composition destinée à l'induction d'une réponse immune de type Th1 à l'encontre d'*Helicobacter*, est dilué en série dans du tampon PBS / Tween. 100
20 µl des dilutions sont ajoutés dans les puits. La plaque est incubée 90 minutes à 37°C, lavée et évaluée selon des procédures standard. Par exemple, on utilise un anticorps de chèvre anti-IgG2a ou anti-IgG1 de souris couplé à une enzyme telle que la peroxydase. L'incubation en présence de cet anticorps est poursuivie 90 minutes à 37°C. On lave la plaque puis la réaction est développée avec le substrat approprié
25 (par exemple de l'O-phenyldiamine dihydrochloride lorsque l'enzyme utilisée est la peroxydase). La réaction est évaluée par colorimétrie (en mesurant l'absorbance par spectrophotométrie). Le titre de l'antisérum en IgG2a ou en IgG1 correspond à l'inverse de la dilution donnant une absorbance de 1,5 à 490 nm.

30 L'induction d'une réponse Th1 utile aux fins de la présente invention est marquée par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 chez la souris qui doit être supérieur à 1/100, 1/50 ou 1/20, avantageusement supérieur à 1/10, de préférence supérieur à 1/3, de manière tout à fait préférée, supérieur à 1/2, 5 ou 10. Lorsque ce rapport est aux alentours de 1, on parle alors de réponse Th1 / Th2 mixte ou
35 équilibrée. Lorsque le rapport est supérieur ou égal à 5, on peut alors parler de réponse Th1 prépondérante.

L'obtention d'une réponse Th1 (ou Th2) chez la souris est prédictive d'une réponse Th1 (ou Th2) chez l'homme. Bien qu'il soit plus facile d'évaluer le type de réponse chez la souris, on peut le faire également chez l'homme en mesurant les taux des cytokines spécifiques de la réponse Th1 d'une part et d'autre part de la réponse
5 Th2, qui sont induites subséquentment. Les réponses Th1 et Th2 peuvent être évaluées directement chez l'homme l'une par rapport à l'autre sur la base des taux de cytokines spécifiques des deux types de réponse (voir ci-dessus) *e.g.*, sur la base du rapport IFN- γ / IL-4.

10 Alternativement, si la méthode de dosage décrite ci-dessus est mise en oeuvre, on peut prévoir que le titre ELISA qui reflète la quantité d'IgG2a, doit être égal ou supérieur à 10 000, de préférence égal ou supérieur à 100 000, de manière particulièrement préférée égal ou supérieur à 1 000 000 ; ceci signifie alors que la réponse Th1 est significative.

15 Le mammifère auquel est destinée la composition pharmaceutique ou la méthode est avantageusement un primate, de préférence un humain.

Selon un mode avantageux, on utilise au moins deux composés ; l'un étant
20 sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et l'autre étant sélectionné parmi des lipides cationiques qui sont des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et ont une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou
25 non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.

Des saponines utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrites dans le brevet US N° 5,057,540 par référence non à leurs structures mais aux
30 fractions dans lesquelles elles sont présentes après fractionnement d'un extrait aqueux de l'écorce de *Quillaja saponaria* Molina, par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et chromatographie à basse pression sur silice. En particulier on cite les fractions QA-7, QA-17, QA-18 et QA-21 aussi dénommée QS-21. L'usage de cette dernière est particulièrement avantageux. Le QS-21 est connu pour être un
35 adjuvant qui favorise l'induction d'une réponse immune majoritairement de type Th1. On parle alors d'adjuvant de type Th1.

Des lipides cationiques utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrits dans le brevet US N° 5,283,185. A titre d'exemple, on cite le iodure de cholesteryl-3 β -carboxyl-amido-ethylenetrimethylammonium, le iodure de 1-dimethylamino-3-trimethylammonio-DL-2-propyl-cholesteryl carboxylate, le iodure
5 de cholesteryl-3 β -carboxyamidoethyleneamine, le iodure de cholesteryl-3 β -oxysuccinamidoethylenetrimethylammonium, le iodure de 1-dimethylamino-3-trimethylammonio-DL-2-propyl-cholesteryl-3 β -oxysuccinate, le iodure de 2-[(2-trimethylammonio)-ethylmethylamino] ethyl-cholesteryl-3 β -oxysuccinate, le 3 β -[N-(polyethyleneimine)-carbamoyl] cholesterol, et le 3 β [N-(N', N'-
10 dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol (DC-chol) ; ce dernier étant particulièrement avantageux. Le DC-chol est connu pour être un adjuvant qui favorise l'induction d'une réponse équilibrée mixte de type Th1 / Th2. On parle alors d'adjuvant de type Th1 / Th2 ou Th1 + Th2.

15 Ces lipides cationiques peuvent être utilisés en dispersion ou bien mis sous forme de liposomes. Des liposomes peuvent être réalisés comme cela est décrit dans le brevet US N° 5,283,185, en associant les lipides cationiques avec un phospholipide neutre *e.g.*, la phosphatidylcholine ou la phosphatidylethanolamine.

20 Des glycolipopeptides utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrits dans le brevet US N° 4,855,283 et EP 206,037. Il s'agit en particulier des glycolipides de formule générale (I) dans laquelle un reste de sucre est un reste 2-amino-2-désoxy-D-glucose ou 2-amino-2-désoxy-D-galactose. Le groupe 2-amino de l'amino-sucre peut être lié à la glycine, la sarcosine, l'acide hippurique, l'alanine, la
25 valine, la leucine, l'isoleucine, la sérine, la thréonine, la cystéine, la méthionine, l'ornithine, la citrulline, l'arginine, l'acide aspartique, l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine, la phénylalanine, la tyrosine, la proline, le tryptophane ou l'histidine sous forme D ou L ou avec des acides aminocarboxyliques comme l'acide α -aminobutyrique, l'acide α -aminovalérianique, l'acide α -aminocaproïque ou l'acide α -
30 aminoheptanoïque sous forme D ou sous forme L.

Plus particulièrement, on cite les glycolipopeptides suivants :

N-(2-glycinamido-2-déoxy- β -deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoyl-
amide,
35 N-(2-glycinamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-actadecanoylamide,
N-(2-glycinamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-tetradecyl-dodecanoylamide,
N-(2-L-alaninamido-2deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoylamide,

N-(2-D-alanimamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-octadecanoylamide,
N-(2-L-phenylalaninamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-octadecanoyl-
amide,

N-(2-L-valinamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanoylamide,

5 N-(2-L-valinamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-tetradecanoylamide,

N-(2-L-leucinamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoylamide,

N-(2-L-leucinamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide

(Bay R1005), et

N-(2-sarcosinamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide.

10

D'autres adjuvants capable de favoriser une réponse immune de type Th1 (c'est-à-dire des adjuvants de type Th1 ou Th1 / Th2) existent dans l'état de la technique parmi lesquels l'homme du métier est capable de sélectionner celui qui correspond le mieux à ses besoins. A titre indicatif, on cite notamment les liposomes ; les ISCOMS
15 ; les microsphères ; les chocléates protéiques ; les vésicules formées de surfactants non-ioniques ; les dispersions d'amphiphiles cationiques dans de l'eau ; les émulsions huile/eau ; le muramidyl dipeptide (MDP) et ses dérivés tels que le glucosyl muramidyl dipeptide (GMDP), le thréonyl-MDP, le muramétide et la murapalmitine ; ainsi que divers autres composés tels que le monophosphoryl-lipide A (MPLA)
20 lipopolysaccharide majeur de la paroi d'une bactérie, par exemple d'*E. coli*, de *Salmonella minnesota*, de *Salmonella typhimurium* ou de *Shigella flexneri* ; l'algane-glucane ; la gamma-inuline ; le calcitriol et la loxoribine.

Des liposomes utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment
25 sélectionnés parmi des liposomes pH-sensibles tels que ceux formés par mélange de d'hémisuccinate de cholestérol (CHEMS) et de dioleyle phosphatidyle éthanolamine (DOPE) ; des liposomes contenant des lipides cationiques reconnus pour leurs propriétés fusiogènes, tels que le 3 bêta -(N-(N',N'-diméthyle aminoéthyle)-carbamoyl) cholestérol (DC-chol) et ses équivalents décrits dans le brevet US N°
30 5,283,185 et WO 96/14831, le bromure de diméthyl dioctadécyl ammonium (DDAB) et les composés BAY décrits dans EP 91645 et EP 206 037, par exemple le Bay R1005 (N-(2-desoxy-2-L-leucylamino-bétaglucopyranosyl)-N-octadecyle dodecanoylamide acétate ; et des liposomes contenant du MTP-PE, un dérivé lipophile du MDP (muramidyl dipeptide). Ces liposomes sont utiles pour adjuvanter tous les
35 agents immunogènes cités.

Des ISCOMs utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi les ceux composés de QuilA ou de QS-21 associé à du cholestérol et éventuellement aussi à un phospholipide tel que la phosphatidylcholine. Ceux ci sont particulièrement intéressants pour la formulation des antigènes lipidés.

5

Des microsphères utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment formés à partir de composés tels que le polylactide-co-glycolide (PLAGA), l'alginate, le chitosan, le polyphosphazène et de nombreux autres polymères.

10

Des chochléates protéiques utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi ceux formés à partir de cholestérol et éventuellement d'un phospholipide additionnel tel que la phosphatidylcholine. Ceux-ci sont surtout intéressants pour la formulation des antigènes lipidés.

15

Des vésicules formées de surfactants non-ioniques utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment formées par un mélange de 1-monopalmitoyl glycérol de cholestérol et de dicetylphosphate. Elles sont une alternative aux liposomes classiques et peuvent être utilisées pour la formulation de tous les agents immunogènes cités.

20

Des émulsions huile/eau utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnées parmi le MF59 (Biocine-Chiron), le SAF1 (Syntex) et les montanides ISA51 et ISA720 (Seppic).

25

L'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est avantageusement sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.

30

Aux fins de la présente invention, une préparation de bactéries inactivées peut être obtenue selon des méthodes conventionnelles bien connues de l'homme de l'art. Il en est de même d'un lysat bactérien. Une dose de bactéries inactivées ou de lysat cellulaire, appropriée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques, peut être déterminée par l'homme de l'art et dépend d'un certain nombre de facteurs tel que l'individu auquel est destiné le vaccin e.g., âge, de l'antigène lui-même, de la voie et du mode d'administration, de la présence/absence ou du type d'adjuvant, ainsi que

35

cela peut être déterminé par l'homme de l'art. D'une manière générale, on indique qu'une dose appropriée est d'environ 50 µg à 1 mg à environ 1 mg, de lysat.

Un peptide ou un polypeptide dérivé d'*Helicobacter* peut être purifié à partir
5 d'*Helicobacter* ou obtenu par les techniques du génie génétique ou bien encore par
synthèse chimique. Ce dernier procédé est avantageux dans le cas des peptides. On
appelle "peptide" toute chaîne d'acides aminés dont la taille est inférieure à environ
50 acides aminés. Lorsque la taille est supérieure, on utilise le terme de "polypeptide"
qui est aussi interchangeable avec le terme "protéine". Un peptide ou polypeptide utile
10 aux fins de la présente invention peut être identique ou similaire à celui existant dans
les conditions naturelles. Il est similaire en ce qu'il est capable d'induire une réponse
immune de la même nature mais il peut comporter certaines variations structurelles
comme par exemple une mutation, l'ajonction d'un résidu de nature lipidique ou bien
être sous forme de peptide ou de polypeptide de fusion.

15 Une dose du peptide ou du polypeptide, appropriée à des fins prophylactiques
ou thérapeutiques, peut être déterminée par l'homme de l'art et dépend d'un certain
nombre de facteurs tel que l'individu auquel est destiné le vaccin e.g., âge, de
l'antigène lui-même, de la voie et du mode d'administration, de la présence/absence
20 ou du type d'adjuvant, ainsi que cela peut être déterminé par l'homme de l'art. D'une
manière générale, on indique qu'une dose appropriée est d'environ 10 µg à environ 1
mg, de préférence à environ 100 µg.

L'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* peut être n'importe quel
25 polypeptide d'*Helicobacter* e.g., d'*H. pylori*. Il peut notamment s'agir d'un
polypeptide présent dans le cytoplasme, d'un polypeptide de la membrane interne ou
externe ou d'un polypeptide sécrété dans le milieu extérieur. De nombreux
polypeptides d'*Helicobacter* ont déjà été décrits dans la littérature, soit par référence
à leur séquence d'acides aminés déduites de la séquence du gène correspondant cloné
30 ou identifié, soit par référence à un procédé de purification qui permet de les obtenir
sous forme isolée du reste de leur environnement naturel. A titre indicatif, on cite en
particulier les document suivants : WO 94/26901 and WO 96/34624 (HspA), WO
94/09023 (CagA), WO 96/38475 (HpaA), WO 93/181150 (cytotoxine), WO
95/27506 et Hazell et al, J. Gen. Microbiol. (1991) 137 : 57 (catalase), FR 2 724 936
35 (recepteur membranaire de la lactoferrine humaine), WO 96/41880 (AlpA), EP 752
473 (FibA) and O'Toole et al, J. Bact. (1991) 173 : 505 (TsaA). D'autres polypeptides
sont aussi décrits dans WO 96/40893, WO 96/33274, WO 96/25430 et WO

96/33220. Un polypeptide utile aux fins de la présente invention peut être identique ou similaire à l'un de ceux cités en référence dans la mesure où il est capable de promouvoir une réponse immune à l'encontre d'*Helicobacter*. A condition de remplir cette dernière condition, l'agent immunogène peut aussi être un peptide dérivé d'un polypeptide cité en référence.

De manière avantageuse, on utilise un polypeptide sélectionné parmi les sous-unités UreA et UreB de l'uréase d'*Helicobacter* (voir WO 90/4030). De préférence, on les utilise toutes les deux, associées en forme d'apoenzyme de l'uréase ou encore sous forme multimérique (voir WO 96/33732).

Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut contenir un unique agent immunogène ou plusieurs. Par exemple une composition avantageuse peut comprendre UreA et UreB *e.g.*, sous forme d'apoenzyme, ainsi que un ou plusieurs autres polypeptides notamment sélectionnés parmi ceux cités ci-avant.

Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut en outre contenir des composés autres que l'agent immunogène lui-même et l'adjuvant de type Th1 ou Th1/Th2 ; la nature de ces composés dépendant dans une certaine mesure de la nature de l'agent immunogène, bactéries inactivées, lysat cellulaire, peptide ou polypeptide. Par exemple une composition peut aussi comprendre un adjuvant capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type Th2 *e.g.* un composé d'aluminium tel que l'aluminium hydroxide, l'aluminium phosphate ou l'aluminium hydroxy phosphate. Ceci peut être avantageux dans le cas où l'adjuvant utile au fins de la présente invention est un adjuvant de type Th1 tel que le QS-21.

L'efficacité thérapeutique ou prophylactique d'une méthode ou d'un usage selon l'invention peut être évaluée selon des méthodes standard *e.g.*, en mesurant l'induction d'une réponse immune ou l'induction d'une immunité thérapeutique ou protectrice en utilisant *e.g.*, le modèle souris / *H. felis* et les procédures décrits dans Lee et al, Eur. J. Gastroenterology & Hepatology (1995) 7 : 303 ou Lee et al, J. Infect. Dis. (1995) 172 : 161. L'homme de l'art s'avisera que *H. felis* peut être remplacé dans le modèle souris par une autre espèce d'*Helicobacter*. Par exemple, l'efficacité d'un agent immunogène dérivé d'*H. pylori* est de préférence évalué dans un modèle souris mettant en oeuvre une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris. L'efficacité peut être déterminée en comparant le degré d'infection dans le tissu

gastrique (en mesurant l'activité uréase, la charge bactérienne ou l'état de la gastrite) à celui d'un groupe contrôle. Il y a effet thérapeutique ou effet protecteur lorsque l'infection est réduite par comparaison au groupe contrôle.

5 Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, elle peut être formulée avec un diluent ou un porteur acceptable d'un point de vue pharmaceutique *e.g.*, de l'eau ou une solution saline. En général, le diluent ou le porteur peut être sélectionné en fonction du mode et de la voie d'administration et selon les pratiques
10 pharmaceutiques standard. Des porteurs ou des diluents appropriés ainsi que ce qui est indispensable à l'élaboration d'une composition pharmaceutique sont décrits dans *Remington's Pharmaceutical Sciences*, un livre de référence standard dans ce domaine.

15 Les méthodes selon l'invention ainsi que les compositions utiles à ces fins peuvent être mises en oeuvre pour traiter ou prévenir *i.a.* les infections à *Helicobacter* et par conséquent, les maladies gastroduodénales associées à ces infections, y compris les gastrites aiguës, chroniques ou atrophiques, les ulcères peptiques *e.g.*, les ulcères gastriques ou duodénaux.

20 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être administrée de manière conventionnelle notamment par voie muqueuse *e.g.*, par voie oculaire, orale *e.g.* buccale ou gastrique, pulmonaire, intestinale, rectale, vaginale ou urinaire ou par voie systémique, notamment parentérale *e.g.*, intraveineuse, intramusculaire,
25 intradermique, intraépidermique et sous-cutanée. De préférence, on utilise la voie parentérale. Lorsque la voie parentérale est mise en oeuvre, on choisit de préférence un site d'administration situé sous le diaphragme d'un individu. La région dorso-lombaire constitue par exemple un site d'administration approprié, notamment pour les voies intraépidermiques, intramusculaire, intradermique et sous-cutanée ; ces
30 dernières étant choisies de préférence à la voie intraveineuse.

Afin d'obtenir un effet protecteur ou thérapeutique, l'opération qui consiste à administrer une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut être répétée une ou plusieurs fois, de préférence au moins deux fois, en laissant
35 un certain intervalle de temps entre chaque administration ; intervalle qui est de l'ordre de la semaine ou du mois. Sa détermination précise est à la portée de l'homme

du métier et peut varier en fonction de divers facteurs tels que la nature de l'agent immunogène, l'âge de l'individu, etc.

5 Selon un mode particulier, le protocole de vaccination est mis en oeuvre en utilisant la même voie d'administration lors de la primo-immunisation et des rappels. Dans ce cas là, on parle par exemple d'administration systémique stricte.

10 "Une méthode dans laquelle l'administration de l'agent immunogène est mise en oeuvre par voie systémique stricte" est définie comme une méthode ne mettant pas en jeu de voie d'administration autre que la voie systémique. Par exemple, une méthode dans laquelle l'agent immunogène est administré par voie systémique et par voie muqueuse, ne répond pas à la définition énoncée ci-avant. En d'autres termes, "une méthode dans laquelle l'administration de l'agent immunogène est mise en oeuvre par voie systémique stricte" doit être comprise comme une méthode dans
15 laquelle l'agent immunogène est administré par voie systémique à l'exclusion de toute autre voie, notamment la voie muqueuse.

A titre illustratif non-limitatif, on évoque un schéma de vaccination qui consiste à administrer l'apoenzyme de l'uréase en association avec le QS-21, le DC-
20 chol ou un de leurs équivalents, trois fois par voie sous-cutanée, dans la région dorso-lombaire avec un intervalle de deux à quatre semaines entre chaque administration.

On peut aussi prévoir que l'administration d'une composition pharmaceutique selon la présente invention peut être une simple étape faisant partie d'un protocole de
25 vaccination plus élaboré. Par exemple, une composition pharmaceutique selon la présente invention peut être précédée ou suivie de l'administration d'une composition pharmaceutique contenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* choisi de manière indépendante parmi ceux énoncés ci-avant ou parmi d'autres tels qu'un vecteur vaccinal ou une molécule d'ADN ; mais ne contenant pas de QS-21, de DC-
30 chol ou un de leurs équivalents ; ceux-ci pouvant alors être remplacé par un tout autre adjuvant ; les deux compositions pouvant être administrées par des voies identiques ou différentes.

A titre illustratif non-limitatif, on évoque les protocoles suivants :
35

- Une primo-immunisation par voie systémique, avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21, suivie de deux rappels avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21 ou de LT par voie muqueuse ; et

- 5 - Une primo-immunisation par voie systémique, avec un poxvirus codant pour UreA et UreB suivie de deux rappels avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21, par voie systémique ou muqueuse.

10 Des agents immunogènes autres que ceux décrits ci-avant et pouvant être utilisés dans un protocole de vaccination multi-étapes comprenant une étape d'administration mettant en jeu un médicament utile aux fins de la présente invention ou une composition selon la présente invention, peuvent être sélectionnés parmi une molécule polynucléotidique, notamment une molécule d'ADN comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le

15 contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule de mammifère ; ou bien encore un vecteur vaccinal comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule de mammifère (si il s'agit d'un vecteur viral) ou chez un procaryote (si il s'agit d'un vecteur bactérien).

20

 La molécule d'ADN peut avantageusement être un plasmide qui est incapable à la fois de se répliquer et de s'intégrer de manière substantielle dans le génome d'un mammifère. La séquence codante citée ci-dessus est placée sous le contrôle d'un promoteur permettant l'expression dans une cellule de mammifère. Ce promoteur

25 peut être ubiquitaire ou spécifique d'un tissu. Parmi les promoteurs ubiquitaires, on cite le promoteur précoce du Cytomegalovirus (décrit dans le brevet US n° 4,168,062) et le promoteur du virus du sarcome de Rous (décrit dans Norton & Coffin, Molec. Cell. Biol. (1985) 5 : 281). Le promoteur desmine (Li et al, Gene (1989) 78 : 244443 ; Li & Paulin, J. Biol. Chem. (1993) 268 : 10403) est un

30 promoteur sélectif permet l'expression dans les cellules musculaires et aussi dans les cellules de la peau. Un promoteur spécifique des cellules musculaires est par exemple le promoteur du gène de la myosine ou de la dystrophine. Des vecteurs plasmidiques que l'on peut utiliser aux fins de la présente invention sont décrits *i.a.*, dans WO 94/21797 et Hartikka et al, Human Gene Therapy (1996) 7 : 1205.

35

 Dans une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention, la molécule nucléotidique *e.g.* la molécule d'ADN peut être formulée ou non. Le

choix de la formulation est très varié. L'ADN peut être simplement dilué dans une solution acceptable d'un point de vue physiologique avec ou sans porteur. Lorsque ce dernier est présent, il peut être isotonique ou faiblement hypertonique et avoir basse force ionique. Par exemple, ces conditions peuvent être remplies par une solution de
5 sucrose *e.g.* à 20 %.

De manière alternative, le polynucléotide peut être associé avec des agents qui favorise l'entrée dans la cellule. Ce peut être (ii) un agent chimique qui modifie la perméabilité cellulaire, telle que la bupivacaine (voir par exemple WO 94/16737) ou
10 (ii) un agent s'associant au polynucléotide et agissant en tant que véhicule facilitant le transport du polynucléotide. Ce dernier peut être notamment des polymères cationiques *e.g.* de la polylysine ou une polyamine *e.g.* des dérivés de la spermine (voir WO 93/18759). Ce peut être également des peptides fusogéniques *e.g.* du GALA ou de la Gramicidine S (voir WO 93/19768) ou bien encore des peptides
15 dérivés des protéines de fusion virales.

Il peut aussi s'agir de lipides anioniques ou cationiques. Les lipides anioniques ou neutres sont connus depuis longtemps comme pouvant servir d'agents de transport, par exemple sous forme de liposomes, à un grand nombre de composés y
20 compris les polynucléotides. Une description détaillée de ces liposomes, de leurs constituants et de leurs procédés de fabrication est par exemple fournit par Liposomes : A Practical Approach, RPC New Ed, IRL press (1990).

Les lipides cationiques sont aussi connus et communément utilisés comme
25 agents de transport pour les polynucléotides. On cite par exemple la Lipofectin™ aussi connue sous le nom de DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride), le DOTAP (1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio) propane), le DDAB (dimethyldioctadecylammonium bromide), le DOGS (dioctadecylamidoglycyl spermine) et les dérivés du cholestérol tel que le DC-chol (3
30 bêta -(N-(N',N'-dimethyl aminoethane)-carbamoyl) cholestérol). Une description de ces lipides est fournie par EP 187,702, WO 90/11092, le brevet US N° 5,283,185, WO 91/15501, WO 95/26356 et le brevet US N° 5,527,928. Les lipides cationiques sont utilisés de préférence avec un lipide neutre tel que le DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine) comme par exemple cela est décrit dans WO 90/11092.

35

Des microparticules d'or ou de tungstène peuvent aussi être utilisées comme agents de transport, tel que c'est décrit dans WO 91/359, WO 93/17706 et Tang et al,

Nature (1992) 356 : 152. Dans ce cas là, le polynucléotide est précipité sur les microparticules en présence de chlorure de calcium et de spermidine puis l'ensemble est administré par jet à haute vitesse dans le derme ou dans l'épiderme, à l'aide d'un appareil sans aiguille tel que ceux décrits dans les brevets US N° 4,945,050 et N°
5 5,015,580 et WO 94/24243.

La quantité d'ADN qui peut être utilisée pour vacciner un individu dépend d'un certain nombre de facteurs tels que par exemple la force du promoteur utilisé afin d'exprimer l'antigène, l'immunogénicité du produit exprimé, la condition du
10 mammifère auquel est destinée l'administration (*e.g.*, le poids l'âge, et l'état de santé général), le mode d'administration et le type de formulation. En général une dose appropriée à un usage prophylactique ou thérapeutique chez un adulte de l'espèce humaine est d'environ 1 µg à environ 5 mg, de préférence d'environ 10 µg à environ 1 mg, et de manière tout particulièrement préférée d'environ 25 µg à environ 500 µg.

15 Parmi les agents immunogènes cités précédemment, on trouve les vecteurs vaccinaux. Parmi les vecteurs d'origine virale on trouve notamment les adénovirus et les poxvirus. Un exemple de vecteur dérivé d'un adénovirus ainsi qu'une méthode pour construire un vecteur capable d'exprimer une molécule d'ADN codant pour un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention sont décrits dans le
20 brevet US N° 4,920,209. Des poxvirus qui peuvent être utilisés de même, sont par exemple les virus de la vaccine et du canarypox. Ils sont décrits de manière respective dans les brevets US N° 4,722,848 et 5,364,773 (voir aussi *e.g.*, Tartaglia et al, Virology (1992) 188 : 217 et Taylor et al, Vaccine (1995) 13 : 539). Des poxvirus
25 capable d'exprimer un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention peuvent être obtenus par recombinaison homologue tel que décrit dans Kieny et al, Nature (1984) 312 : 163, de manière à ce que le fragment d'ADN codant pour le peptide ou le polypeptide soit placé dans des conditions appropriées à son expression dans des cellules de mammifères. Un vecteur bactérien tel que le Bacille bilié de
30 Calmette-Guérin peut être aussi envisagé.

D'une manière générale, la dose d'un vecteur viral destinée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques peut être d'environ 1×10^4 à environ 1×10^{11} , de manière avantageuse d'environ 1×10^7 à environ 1×10^{10} , de préférence d'environ
35 1×10^7 à environ 1×10^9 unités formant plaques *per* kilogram.

Parmi les vecteurs bactériens, on cite notamment *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Des souches mutantes non-toxiques de *Vibrio cholerae* qui peuvent être utiles comme vaccin vivant, sont décrites dans Mekalanos et al, Nature (1983) 306 : 551 et le brevet US N° 4,882,278 (souche dans laquelle une partie substantielle de la région codant pour chacun des deux allèles *ctxA* a été délétée de manière à ce qu'aucune toxine fonctionnelle ne puisse être produite) ; WO 92/11354 (souche dans laquelle le locus *irgA* est inactivé par mutation ; cette mutation peut être combinée dans une même souche avec des mutations *ctxA*) ; WO 94/1533 (mutant obtenu par délétion à qui il manque des sequences fonctionnelles *ctxA* et *attRSI*). Ces souches peuvent être modifiées génétiquement afin d'exprimer des antigènes hétérologues tel que décrit dans WO 94/19482.

Des souches atténuées de *Salmonella typhimurium* modifiées génétiquement ou non pour l'expression recombinante d'antigènes hétérologues, ainsi que leurs usage en tant que vaccins sont décrits dans Nakayama et al, BioTechnology (1988) 6 : 693 et WO 92/11361.

D'autres bactéries utiles en tant que vecteurs vaccinaux sont décrits dans High et al, EMBO (1992) 11 : 1991 et Sizemore et al, Science (1995) 270 : 299 (*Shigella flexneri*) ; Medaglini et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92 : 6868 (*Streptococcus gordonii*) ; et Flynn J.L. Cell. Mol. Biol. (1994) 40 (suppl. I) : 31, WO 88/6626, WO 90/0594, WO 91/13157, WO 92/1796 et WO 92/21376 (Bacille de Calmette Guérin).

Dans les vecteurs bactériens la séquence d'ADN codant pour un peptide ou polypeptide d'*Helicobacter* peut être insérée dans le génome bactérien ou bien rester à l'état libre, portée par un plasmide.

De même une molécule d'ADN ou un vecteur vaccinal peuvent comporter une séquence codant pour n'importe quel polypeptide ou peptide décrit ci-dessus.

Une molécule d'ADN, de préférence un vecteur vaccinal viral peut aussi comporter une séquence codant pour une cytokine, par exemple une lymphokine telle que l'interleukine-2 ou -12, sous le contrôle d'éléments appropriés pour expression dans une cellule de mammifère. Une alternative à cette option consiste aussi à ajouter dans une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention

comprenant une molécule d'ADN ou un vecteur, une autre molécule ou vecteur viral codant pour une cytokine.

5 D'une manière générale, l'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique destinée à traiter ou à prévenir une infection à *Helicobacter* qui comprend pour administration consécutive : (i) un premier produit contenant (a) un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* sélectionné de manière indépendante, parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée, et (b) un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type Th1 et (ii) un deuxième produit contenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* sélectionné de manière indépendante, parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée, une molécule d'ADN comportant 15 une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et un vecteur vaccinal comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression ; de préférence à condition que, lorsqu'un premier produit contient un peptide ou un polypeptide et un deuxième 20 produit contient une molécule d'ADN ou un vecteur vaccinal, ladite séquence codante de la molécule d'ADN ou du vecteur vaccinal code pour le peptide ou polypeptide contenu dans le premier produit.

25 Dans la description ci-avant on s'est essentiellement référé aux infections à *Helicobacter* et aux moyens de les combattre en prévention et en prophylaxie. Néanmoins, on doit comprendre que les principes et méthodes énoncés ci-avant peuvent s'appliquer *mutatis mutandis* à toute autre infection induite par un microorganisme quelconque dont le siège est l'estomac le duodénum ou l'intestin.

30 On précise en outre que tous les documents publiés et cités dans la présente demande sont incorporés par référence.

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

35 La Figure 1 se réfère à l'Exemple 1 et présente les niveaux d'activité uréase après épreuve, mesurée 4 hrs après le sacrifice des souris ayant reçues par 3 fois, à J0, J28 et J56 : (a) une préparation d'uréase encapsulée à environ 80 % dans des

liposomes DC-chol, dans les muscles dorso-lombaires ; ou (b) une préparation d'uréase adjuvantée par de la toxine cholérique, par voie intragastrique. Les expériences (c) et (d) correspondent respectivement aux témoins positifs et négatifs.

5 La Figure 2 se réfère à l'Exemple 1 et présente les niveaux d'activité uréase après épreuve, mesurée 4 hrs après le sacrifice des souris ayant reçues par 3 fois, à J0, J28 et J56 : (a) une préparation d'uréase adjuvantée par de la toxine cholérique, par voie intragastrique ou (b) une préparation d'uréase adjuvantée par du PCPP, par voie sous-cutanée dans la partie sous-lombaire postérieure gauche ; ou (c) une préparation
10 d'uréase adjuvantée par du QS-21, par voie sous-cutanée dans le bas du dos. Les expériences (c) et (d) correspondent respectivement aux témoins positifs et négatifs.

 La Figure 3 présente les quantités d'immunoglobulines sériques induites chez les singes soumis à des protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 2, et exprimées en titre ELISA. Un groupe contrôle comprenant 4 singes et trois groupes
15 test sont formés, chacun des groupes test comprenant 8 singes ; chaque groupe test est divisé en deux sous-groupes de 4 singes, l'un recevant uniquement la préparation *H. pylori* inactivée (1, 2 et 3) et l'autre recevant la préparation *H. pylori* inactivée et de l'uréase recombinante (1u, 2u et 3u). Le groupe 1 et 1u correspond au protocole d'administration [nasal + intragastrique, 4 fois] ; le groupe 2 et 2u correspond au
20 protocole d'administration [intramusculaire, 4 fois] ; le groupe 3 et 3u correspond au protocole d'administration [nasal + intragastrique, intramusculaire, nasal + intragastrique, intramusculaire]. Le titre ELISA est mesuré trois fois : une première fois, à J0 (bande blanche), une deuxième fois à J42 (bande grise), une troisième fois à
25 J78 (bande noire).

 La Figure 4 présente les quantités d'immunoglobulines sériques induites chez les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, et exprimées en titre ELISA. ○ indique le titre ELISA en IgG2a et ◆ indique le titre
30 ELISA en IgG1. Deux groupes contrôle (témoins positif et négatif), quatre groupes test (A1 à A4) ainsi qu'un groupe de référence (LT) sont formés ; chacun des groupes comprenant 10 souris. Les mesures des quantités d'immunoglobulines sériques sont effectuées pour seulement 5 souris parmi les dix. Les souris des groupes A1 à A4 ont reçues des doses de 10 µg d'uréase par voie sous cutanée dans la partie sous-lombaire postérieure gauche, en présence de QS-21 (A1), Bay R1005 (A2), DC-chol (A3) ou
35 de PCPP (A4). Les souris du groupe de référence ont reçues des doses de 40 µg d'uréase par voie orale en présence de la protéine heat-labile d'*E. coli*.

La Figure 5 présente les taux d'activité uréase mesurés au niveau de la muqueuse stomacale, à DO_{550} 4 heures après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels
5 que décrits pour la Figure 4.

La Figure 6 présente les taux d'activité uréase mesurés au niveau de la muqueuse stomacale, à DO_{550} 24 heures après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes
10 sont tels que décrits pour la Figure 4.

La Figure 7 présente la charge bactérienne mesurée au niveau de la muqueuse stomacale, après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels que décrits pour la Figure 4.
15

Exemple 1 : Etudes d'immunisation chez la souris

1A - Matériel et méthodes

5 Souris

Des souris femelles Swiss de 6/8 semaines ont été fournies par Janvier (France). Pendant toute la durée de l'expérience on a utilisé du matériel stérilisé ; les cages étaient protégées par des "isocaps" ; les souris ont été nourries avec de l'eau filtrée et des aliments irradiés.

10

Protocole d'administration

Lors de chaque expérience, les souris ont reçues 3 doses du même produit ; chaque dose à 28 jours d'intervalle (les jours 0, 28 et 56). L'administration du produit a été effectuée par voie nasale (jusqu'à 50 µl sur les souris éveillées), par voie orale (300 µl en 0,2 M NaHCO₃ par gavage gastrique), ou par voie sous-cutanée (300 µl sous la peau du cou ou sous la peau du côté gauche de la région lombaire). Dans certains cas, une inoculation intramusculaire a été effectuée (50 µl) dans les muscles dorso-lombaires des souris anesthésiées. 10 µg d'uréase ont été administrés par voie nasale, sous cutanée ou intramusculaire, et 40 µg par voie orale. En ce qui concerne la

15

20

préparation bactérienne inactivée, 400 µg de cellules ont été administrés par voie sous cutanée ou par voie orale.

Antigènes et adjuvants

25 L'apoenzyme de l'uréase d'*H. pylori* a été exprimée dans *E. coli* et purifiée comme cela a été décrit dans l'exemple 5 de WO96/31235. Dans la suite du texte pour désigner cette apoenzyme, on emploie le simple terme d'uréase.

Des liposomes DC-chol contenant de l'uréase sont préparés comme suit : Tout d'abord, afin d'obtenir un film lipidique sec contenant 100 mg de DC-chol (R-Gene Therapeutics) et 100 mg de DOPC (dioleylphosphatidylcholine) (Avanti Polar Lipids), on mélange ces produits sous forme de poudre dans environ 5 ml de chloroforme. On laisse la solution s'évaporer sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le film ainsi obtenu sur les parois du récipient est séché sous vide poussé pendant au moins 4 hrs. En parallèle, 20 mg d'un lyophilisat d'uréase et 100 mg de sucrose sont dilués dans 13.33 ml de tampon Hepes 20 mM pH 7.2. Dix ml de cette

30

35

préparation (qui contient 1.5 mg d'uréase et 0.75 % de sucrose) est filtrée sur filtre

Millex 0.220 μm , puis utilisée pour réhydrater le film lipidique. La suspension est mise sous agitation pendant 4 hrs puis soit extrudée (10 passages sur membrane de polycarbonate 0.2 μm) ou microfluidisée (10 passages sous une pression de 500 kPa dans un microfluidiseur Y10 de Microfluidics Co). Dans la suspension de liposomes
5 ainsi obtenue le taux d'uréase encapsulée est de 10 à 60 %. Cette suspension est lyophilisée après avoir ajusté la concentration en sucrose à 5 % (on ajoute 425 mg de sucrose pour 10 ml). Avant utilisation, le lyophilisat est repris par un volume d'eau ou de tampon approprié et la suspension est purifiée sur un gradient discontinu de sucrose (paliers de 0, 30 et 60 %) de manière à obtenir une préparation dans laquelle
10 la quantité d'uréase encapsulée est supérieure à 70 % environ par rapport à la quantité totale d'uréase.

La toxine cholérique est utilisée comme adjuvant mucosal à raison de 10 μg / dose d'uréase ou de préparation bactérienne.

15 Le QS-21 (Cambridge Biosciences) est utilisé comme adjuvant à raison de 15 μg / dose d'uréase.

Le polyphosphazène (PCPP) (Virus Research Institute) est utilisé comme adjuvant à
20 raison de 100 μg / dose d'uréase.

Epreuve

Deux semaines après le deuxième rappel, les souris ont été soumises à un gavage gastrique avec 300 μl d'une suspension d'une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris,
25 la souche ORV2002 (1×10^7 bactéries vivantes dans 200 μl de PBS ; DO_{550} de 0.5 environ). Un groupe n'ayant reçu aucune dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même.

Analyse de l'épreuve

30 Quatre semaines après l'épreuve, les souris ont été sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales. Les estomacs ont été prélevés pour évaluer l'activité uréase et faire des analyses histologiques. L'activité uréase a été évaluée après 4 et 24 heures (DO à 550 nm) avec le Jatrox test, Procter & Gamble) et après 24 heures le nombre de souris encore négatives (DO inférieure à 0,1) a été relevé.

Mesure de réponse anticorps locale par ELISPOT (glandes salivaires et estomac).

Les ELISPOT ont été exécutés conformément à Mega et al, J. Immunol. (1992) 148 :
5 2030. Les plaques ont été enduites d'un extrait de protéines d'*H. pylori* à une concentration de 50 µg/ml.

Pour tester la réponse anticorps au niveau de l'estomac nous avons modifié la méthode comme suit : La moitié de l'estomac a été coupée en morceau de 1mm² avec
10 un appareil automatique pour couper les tissus humains (Mc Illwain Laboratories, Gilford, UK) et la digestion effectuée avec de la Dispase (2 mg/ml, Boeringher Mannheim) dans 2 ml d'une solution de Joklik modifiée à laquelle ont été ajoutés
15 10 % de sérum de cheval (Gibco), de la glutamine et des antibiotiques. Quatre digestions d'une 1/2 heure ont été exécutées à 37° C avec brassage doux. Les cellules ainsi digérées ont été filtrées après chaque étape à l'aide de filtres 70 µm (Falcon), puis lavées 3 fois dans une solution de RPMI 1640 (Gibco) complémentée à 5 % de
20 de sérum de veau foetal (FCS), et incubées dans la même solution pendant au moins 4 heures dans des plaques recouvertes de nitrocellulose (Millipore) (100 µl/puits, 4 puits). Par moitié d'estomac, on obtient entre 1 et 3.10⁵ cellules (les cellules de grande taille et les macrophages n'ont pas été comptées).

L'IgA biotinylée et le complexe streptavidine - peroxydase biotinylée provenaient d'Amersham. Les spots ont été révélés sous l'action du substrat AEC (Sigma) et dès
25 que les plaques sont sèches, ils ont été comptés sous un microscope (grossissement 16 ou 40X). Les valeurs moyennes correspondant au nombre de taches (spots) d'IgA dans quatre puits ont été calculées et exprimées comme le nombre de taches/10⁶ cellules.

Analyse de la réponse par ELISA

30 Les analyses par ELISA ont été exécutées conformément au protocole standard (les conjugués biotinylés et la streptavidine peroxydase provenaient de chez Amersham et le substrat OPD (O-phenyldiamine dihydrochloride) de chez Sigma). Les plaques étaient enduites d'extraits *H. pylori* (5µg/ml) dans du tampon carbonate. Un sérum de contrôle de souris dirigé contre l'extrait d'*H. pylori* a été introduit dans chaque
35 expérience. Le titre correspond à l'inverse de la dilution donnant une DO de 1,5 à 490 nm.

1B - Résultats

Les résultats sont présentés dans les Figures 1 et 2 décrites ci-avant et commentées comme suit :

5

Avant tout commentaires au sujet des Figures 1 et 2, on note que ces figures présentent les résultats obtenus avec l'antigène utilisé adjuvanté par de la toxine cholérique et administré par voie intragastrique. Cette expérience est dite expérience de référence standard dans la mesure où l'association de l'art antérieur CT / IG est
10 celle qui donne les meilleurs résultats à ce jour.

La Figure 1 montre qu'une préparation d'uréase encapsulée dans des liposomes DC-chol donne d'aussi bons résultats que ceux obtenus dans l'expérience de référence standard.

15

De plus, on fait référence aux expériences (a) à (d) dont les résultats en termes d'activité uréase 4 hrs après que les souris aient été sacrifiées sont reportés dans la Figure 1 et on indique que le nombre de souris qui sont toujours négatives pour l'activité uréase 24 hrs après avoir été sacrifiées est respectivement (a) 5/10, (b) 4/10,
20 (c) 0/10 et (d) 10/10. Ceci est en accord avec ce qui a été conclu au paragraphe précédemment ; à savoir que l'expérience (a) conduit à des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'expérience de référence standard.

La Figure 2 montre qu'une préparation d'uréase adjuvantée par le QS-21 donne
25 d'aussi bons résultats que ceux obtenus dans l'expérience de référence standard. De plus, cette figure montre que les résultats que l'on obtient en utilisant le PCPP à titre d'ajuvant sont beaucoup moins bons que ceux obtenus avec le QS-21. Ceci s'explique dans la mesure où le PCPP induit préférentiellement avec l'uréase une réponse de type Th2 tandis que le QS-21 avec l'uréase induit une réponse équilibrée Th1/Th2 ;
30 ainsi que cela est démontré dans le tableau ci après.

De plus, on fait référence aux expériences (a) à (e) dont les résultats en termes d'activité uréase 4 hrs après que les souris aient été sacrifiées sont reportés dans la Figure 2 et on indique que le nombre de souris qui sont toujours négatives pour
35 l'activité uréase 24 hrs après avoir été sacrifiées est respectivement (a) 1/8, (b) 0/8, (c) 5/8, (d) 0/8 et (e) 10/10. Ceci est en accord avec ce qui a été conclu au paragraphe

précédemment ; à savoir que l'expérience (c) conduit à des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'expérience de référence standard.

5 Le tableau ci-après présente les quantités d'IgA, IgG1 et IgG2a sériques induites lors des expériences dont les résultats en termes d'activité uréase sont reportés dans les Figures 1 et 2 ainsi que le nombre de souris dont l'activité uréase est caractérisée par une DO inférieure à 0.1 après 4 et 24 hrs après sacrifice. Les quantités d'IgA, IgG1 et IgG2a sont exprimées en titre ELISA.

10

	urease CT IG	urease DC-chol SC	uréase PCPP SC	urease QS21 SC
IgA	45	0	58	1
IgG1	65700	620000	2930520	2970399
IgG2a	20200	321000	26200	1136095
DO < 0.1 4 hrs	5/10	5/10	0/8	6/8
DO < 0.1 24 hrs	4/10	5/10	0/8	5/8

15 Les résultats présentés dans le tableau ci-avant montrent que lorsque la voie sous-cutanée est employée (ainsi qu'un adjuvant approprié pour cette voie), le taux d'anticorps sérique est important ; ce qui n'est pas le cas après usage de la voie intragastrique (et de l'adjuvant qui est approprié à cette voie). De plus, ces résultats
20 montrent que lorsque l'on utilise le DC-chol ou le QS-21, on obtient un fort taux d'IgG2a, comparable au taux d'IgG1 en ordre de grandeur. Ceci indique que ces adjuvants ont la capacité d'induire non seulement une réponse Th2, mais aussi une réponse Th1. Par contre, lorsque l'on utilise le PCPP, le taux d'IgG2a obtenu est nettement plus faible que le taux d'IgG1. On en conclut que ce dernier adjuvant induit essentiellement une réponse Th2 et ne peut donc pas être un adjuvant utile aux fins de la présente invention.

Exemple 2 : Etudes d'immunisation chez les singes

2A - Matériel et méthodes

5 Singes

Vingt huit singes (*Macaca fascicularis*) âgés de 2 ans et originaires de l'île Maurice ont été utilisés dans cette étude. Avant de sousmettre les singes aux différents protocoles d'immunisation décrits ci-après, une biopsie a révélé que la plupart d'entre eux étaient infectés de manière chronique par des organismes proches de *Gastrospirillum hominis* (GHLO) ou de *H. heilmanii*.

Protocoles d'administration

Puisque presque tous les singes étaient infectés par des GHLO, on a décidé de tester l'efficacité de différents protocoles en thérapie. Trois protocoles ont été mis en oeuvre, tels que résumés dans le tableau ci après :

Groupe	J0	J21	J42	J63
1 et 1u	IN + IG	IN + IG	IN + IG	IN + IG
2 et 2u	IM	IM	IM	IM
3 et 3u	IM	IN + IG	IM	IN + IG

On précise que l'administration par voie intramusculaire a été effectuée dans les muscles dorso-lombaires.

Antigènes et adjuvants

Dans la mesure où il existe une réactivité croisée entre les GPLO et *H. pylori*, on a choisit d'utiliser une préparation de bactéries *H. pylori* inactivées, telle que décrite dans l'exemple 1A, seule ou en combinaison avec de l'uréase recombinante préparée selon la méthode référencée dans l'exemple 1A.

La heat-labile toxine d'*E. coli* (LT) (Sigma) ou la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) (Pasteur Mérieux sérums & vaccins) a été utilisé comme adjuvant mucosal tandis que le DC-chol a été utilisé comme adjuvant parentéral. De la poudre de DC-chol est simplement réhydratée par une préparation d'antigène.

Les doses utilisées sont comme suit :

Voie	Germes	Urease	DC-chol	LT	CTB
IG	400 µg	2,5 mg	-	25 µg	-
IN	400 µg	400 µg	-	25 ng	25 µg
IM	400 µg	100 µg	400 µg	-	-

Biopsies, test uréase et étude bactériologique / histologique

- 5 On a effectué une biopsie sur chacun des singes avant et après immunisation (un mois après le troisième rappel). A partir des biopsies, un test uréase et une étude histologique ont été mis en oeuvre.

L'activité uréase est évaluée en utilisant le kit Jatrox (Procter & Gamble).

- 10 L'importance de cette activité est estimée comme suit, de manière décroissante : niveau 3, coloration rose apparaissant au cours des 10 premières minutes ; niveau 2, coloration rose apparaissant entre 10 et 30 minutes après l'adjonction des réactifs ; niveau 1, coloration rose apparaissant entre 30 min et 4 hrs et niveau 0, coloration faible ou inexistante après 4 hrs.

- 15 Les études histologiques ont été réalisées à partir de biopsies fixées dans du formol et la charge bactérienne quantifiée comme suit : absence de bactéries (0) ; quelques bactéries de type *Helicobacter* (0,5) ; d'assez nombreuses bactéries (1) ; de nombreuses bactéries (2) ; de très nombreuses bactéries (3). Une différence d'un niveau (de 1 à 2 par exemple) correspond à un nombre 5 fois plus important de bactéries.
- 20

Analyse de la réponse par test ELISA

Un test ELISA est mis en oeuvre comme décrit dans l'exemple 1A.

25

1B - Résultats

- Le tableau ci-dessous est relatif à la charge bactérienne qui, avant et après immunisation, est appréciée à l'aide de deux tests : (i) en évaluant l'activité uréase et
- 30 (ii) en effectuant une étude histologique. Les résultats y afférant sont présentés dans les colonnes 3 à 6. Les trois dernières colonnes indiquent pour chaque groupes (contrôle, 1, 2 ou 3) le nombre de singes pour lesquels la charge bactérienne reste

inchangée après immunisation (→) d'après les deux tests ; ou apparaît moindre (↘) ou accrue (↗) dans au moins un des deux tests, l'autre test indiquant une charge bactérienne stationnaire. Lorsque les résultats des deux tests vont dans le même sens, la flèche ascendante ou descendante est double.

5

Singes	Groupe	Activité Urease		Histologie		Variation		
		avant immunisation	après immunisation	avant immunisation	après immunisation	↘	→	↗
H 282	C	2-2	3-2	2	3-2	1/4	1/4	2/4 (2/4 ↗↗)
J 005	C	2-2	2-1	2	1-0			
J 852	C	0-0	2-0	0	1-1			
J 476	C	0-0	2-0	0	1-1			
H 799	I	2-2	2-2	2	2-2	1/8	5/8	2/8 (1/8 ↗↗)
J 845	I	2-2	3-2	2	2-1			
J 205	I	1-1	2-2	0	1			
J 328	I	2-2	1-2	3	3-2			
J 197	Iu	2-2	3-2	2	3			
H 025	Iu	2-2	2-2	1	1-1			
G 460	Iu	2-2	3-2	3	2-3			
J 607	Iu	2-2	2-2	2	2			
H 549	2	3-3	2-2	3	2-3	6/8	1/8	1/8
H 622	2	3-3	1-1	2	2-3			
H 504	2	3-3	1-1	2	2-1			
H 798	2	1-1	0-1	1	1-1			
J 367	2u	2-2	2-1	3	2-3			
G 486	2u	2-2	2-2	1	2-2			
J 522	2u	2-2	0-0	2	2-2			
G 722	2u	3-3	2-0	2	2-3			
H 820	3	3-3	2-2	3	2-2	5/8 (3/8 ↘↘)	0	3/8
J 557	3	2-2	1-0	2	1-2*			
H 588	3	2-2	2-0	3	1-2			
J 153	3	3-3	3-3	2	3-3			
H 480	3u	2-2	2-2	2	3-3			
J 344	3u	3-3	2-0	3	2-2			
H 710	3u	2-2	2-2	2	3-3			
J 262	3u	3-3	2-2	3	3-2			

Ainsi, ce tableau révèle que dans le groupe ayant été soumis à un protocole d'immunisation par la voie muqueuse stricte, les résultats sont sensiblement identiques à ceux obtenus avec le groupe contrôle négatif. Par contre, dans les
5 groupes ayant été soumis à un protocole d'immunisation par voie mixte muqueuse et intramusculaire ou par la voie intramusculaire stricte, on observe une nette réduction de la charge bactérienne. Ceci met en lumière l'importance des conditions d'immunisation et en particulier de l'adjuvant utilisé ; et en conséquence, on recommande l'usage d'un adjuvant tel que le DC-chol, capable de favoriser une
10 réponse Th1 et Th2 équilibrée, afin d'obtenir un effet protecteur.

Ces résultats sont à mettre en perspective avec d'autres résultats relatifs aux taux d'anticorps sériques qui sont présentés dans la Figure 3. Cette figure montre que le schéma d'immunisation par voie muqueuse stricte (1 et 1u) conduit à des résultats
15 très similaires à ceux du groupe contrôle négatif. Par contre, le schéma d'immunisation par voie mixte muqueuse et intramusculaire (2 et 2u) et mieux encore le schéma d'immunisation par voie intramusculaire stricte (3 et 3u), permet d'induire des taux d'anticorps nettement supérieurs à ceux du groupe contrôle.

20 Ainsi, une réponse sérique importante peut être corrélée à un effet protecteur, tandis qu'*a contrario*, une faible réponse est liée à l'absence d'effet protecteur. Les conditions d'immunisation permettant d'obtenir l'effet désiré (réponse sérique importante et effet protecteur) inclut l'usage de la voie parentérale ciblée dans la région sous-diaphragmatique ou celui d'un adjuvant Th1.

25

Exemple 3 : Autres études d'immunisation chez la souris

3A - Matériel et méthodes

5 Souris

Des souris femelles Swiss de 6/8 semaines ont été fournies par Janvier (France). Pendant toute la durée de l'expérience on a utilisé du matériel stérilisé ; les cages étaient protégées par des "isocaps" ; les souris ont été nourries avec de l'eau filtrée et des aliments irradiés.

10

Protocole d'administration

Lors de chaque expérience, les souris ont reçues 3 doses du même produit ; chaque dose à 21 jours d'intervalle (les jours 0, 21 et 42). L'administration du produit a été effectuée par voie orale (300 µl en 0,2 M NaHCO₃ par gavage gastrique), ou par voie sous-cutanée (300 µl sous la peau du côté gauche de la région lombaire). Dix µg d'uréase ont été administrés sous cutanée et 40 µg par voie orale.

15

Antigènes et adjuvants

20 L'apoenzyme de l'uréase d'*H. pylori* a été exprimée dans *E. coli* et purifiée comme cela a été décrit dans l'exemple 5 de WO96/31235. Dans la suite du texte pour désigner cette apoenzyme, on emploie le simple terme d'uréase.

25 La heat-labile toxine d'*E. coli* (Sigma) est utilisée comme adjuvant mucosal à raison de 1 µg / dose d'uréase.

Le QS-21 (Cambridge Biosciences) est utilisé comme adjuvant à raison de 15 µg / dose d'uréase.

30 Le Bay R1005 (Bayer) est utilisé comme adjuvant à raison de 400 µg / dose d'uréase.

Le DC-chol (R-Gene Therapeutics) est utilisé comme adjuvant à raison de 65 µg / dose d'uréase.

35 Le polyphosphazène (PCPP) (Virus Research Institute) est utilisé comme adjuvant à raison de 100 µg / dose d'uréase.

Epreuve

- Quatre semaines après le deuxième rappel, les souris ont été soumises à un gavage gastrique avec 300 µl (3×10^6 bactéries vivantes) d'une suspension d'une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris et résistante à la Streptomycine, la souche ORV2001. Un
- 5 groupe n'ayant reçu aucune dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même.

- La suspension d'épreuve est préparée comme suit : *H. pylori* est cultivée sur agar Muller-Hinton (Difco) contenant 5 % de sang de mouton (bioMérieux) (milieu MHA) qui contient les antibiotiques suivants de chez Sigma : Triméthoprim 5 µg/ml,
- 10 Vancomycine 10 µg/ml, Polymixine B 1.3 µg/ml, Amphotéricine 5 µg/ml et Streptomycine 50 µg/ml. Les boîtes de culture sont incubées pendant 3 jours à 37°C dans des conditions de microaérophilie (Anaerocult C, Merck). Cette culture est récoltée pour ensemen
- 15 ser un flacon pourvu d'évents de 75 cm² (Costar) contenant 50 ml de Brucella broth complété par 5 % de sérum de veau foetal et par les antibiotiques sus-nommés. Le flacon est incubé dans des conditions de micro aérophilie, sous agitation douce pendant 24 heures. La suspension est alors diluée en Brucella broth pour donner une DO de 0,1 à 550 nm (soit 10^7 CFU/ml).

Analyse de l'épreuve

- 20 Quatre semaines après l'épreuve, les souris ont été sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales. Les estomacs ont été prélevés pour évaluer l'activité uréase et la charge bactérienne par culture quantitative. Un quart longitudinal de l'estomac (antrum + corpus) est utilisé pour chacun des tests. L'activité uréase a été évaluée après 4 et 24 heures (DO à 550 nm) avec le Jatrox test, Procter & Gamble) et après 24 heures le
- 25 nombre de souris encore négatives (DO inférieure à 0,1) a été relevé.

Evaluation de l'infection par culture quantitative d'*H. pylori*

- Au moment où les souris sont sacrifiées, la muqueuse d'un quart de l'estomac de chaque souris est disposée dans le milieu Portagem de bioMérieux puis dans les deux
- 30 heures qui suivent, transférée en chambre de culture. L'échantillon est alors homogénéisé en utilisant un homogénéisateur de Dounce (Wheaton, Millville USA) contenant 1 ml de milieu Brucella (Brucella broth) et dilué en série jusqu'à 10^{-3} . Cent µl de chaque dilution (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) sont répandus dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MHA supplémenté par les antibiotiques sus-nommés, pour
- 35 culture à 37°C dans des conditions de microaérophilie pendant 4 ou 5 jours. On décompte alors le nombre de bactéries viables. *H. pylori* est identifiée par sa

morphologie révélée par une coloration de Gram et par des réactions positives à des tests uréase, catalase et oxidase.

Analyse de la réponse par ELISA

- 5 Les analyses par ELISA ont été exécutées conformément au protocole standard (les conjugués biotinylés et la streptavidine peroxydase provenaient de chez Amersham et le substrat OPD de chez Sigma). Les plaques étaient enduites d'extraits *H. pylori* (5µg/ml) dans du tampon carbonate. Un sérum de contrôle de souris dirigé contre l'extrait d'*H. pylori* a été introduit dans chaque expérience. Le titre correspond à
10 l'inverse de la dilution donnant une DO de 1,5 à 490 nm.

3B - Résultats

- 15 Avant tout commentaires au sujet des Figures 4 à 7, on note que ces figures présentent les résultats obtenus avec l'antigène utilisé adjuvanté par de la LT et administré par voie intragastrique. Cette expérience est dite expérience de référence standard dans la mesure où l'association de l'art antérieur LT / IG est celle qui donne les meilleurs résultats à ce jour.

20 Réponse sérique

- Comme montré dans la Figure 4, après trois immunisations, toutes les souris immunisées par voie sous-cutanée présentent une réponse sérique importante en IgG. Sur la base des rapports IgG1:IgG2a, on remarque que le PCPP induit une réponse prédominante de type Th2 (fort taux IgG1, faible taux IgG2a). Le Bay R1005 et le
25 DC-chol induisent une réponse plus équilibrée de type Th1 / Th2. Enfin le QS-21 induit une réponse prédominante de type Th1. En fait, la différence principale entre les quatre groupes de souris A1 à A4 réside dans leurs titres IgG2a, les titres IgG1 étant tous similaires.

30 Protection après épreuve

- Les Figures 5 à 7 montrent que le niveau de protection dans les groupes A1 et A2 est similaire à ou même meilleur que celui observé dans le groupe de référence (LT). Ils s'agit des groupes ayant reçues les doses d'uréase en présence du QS-21 et du Bay R1005 respectivement. Le groupe A3 (DC-chol) présente un niveau de protection
35 légèrement moindre. Par contre, dans le groupe A4 (PCPP), il n'est pas possible de mettre en évidence un effet protecteur important. On note que les résultats présentés dans les Figures 5 à 7 sont consistents entre eux.

- Lorsque l'on met en parallèle les résultats présentés dans la Figure 4 d'une part et les Figures 5 à 7 d'autre part, on est en droit de conclure que l'usage d'un adjuvant capable d'induire une réponse Th1 ou Th1 / Th2 (QS-21, Bay R1005 ou DC-chol)
- 5 favorise la mise en place d'un effet protecteur ; contrairement à l'usage d'un adjuvant de type Th2 (PCPP).

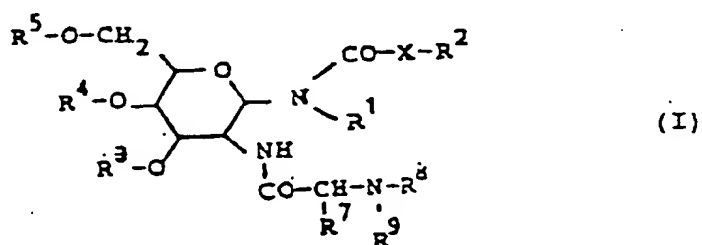
Revendications

1. Une composition pharmaceutique qui comprend un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et au moins un composé sélectionné parmi :

(i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;

(ii) des lipides cationiques qui sont des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et ont une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires ; et

(iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle

R¹ représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,

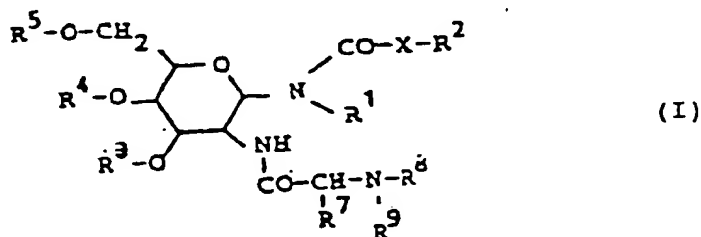
X représente -CH₂-, -O- ou -NH-,

R² représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,

R³, R⁴ et R⁵ représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl-CO-R⁶, dans lequel R⁶ représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,

- 5 R⁷ représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C₁-C₇,
hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-
(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-
guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle,
carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle,
benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-
imidazolylméthyle,
- 10 R⁸ représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- R⁹ représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle,
trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-
butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et
- 15 R⁷ et R⁸ peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe
-CH₂-CH₂-CH₂-.
- 20 2. Une composition selon la revendication 1, qui comprend au moins deux
composés ; un premier composé étant sélectionné parmi les saponines purifiées
à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et un deuxième composé étant
sélectionné parmi des lipides cationiques qui sont des inhibiteurs faibles de la
protéine kinase C et ont une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé
du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les
carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée
25 ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné
parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.
- 30 3. Une composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le composé est
une saponine qui est la fraction QS-21 purifiée à partir d'un extrait de *Quillaja*
saponaria.
4. Une composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le composé est un
lipide cationique mis sous forme de liposome.
- 35 5. Une composition selon la revendication 1, 2 ou 4, dans laquelle le composé est
un lipide cationique qui est le 3-bêta-(N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-
carbamoyl) cholestérol (DC-chol).

6. Une composition selon la revendication 1, dans laquelle le composé est un glycolipopeptide qui est le N-(2-L-leucinamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide (Bay R1005).
7. Une composition selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.
8. Une composition selon la revendication 7, dans laquelle l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est la sous-unité UreB ou UreA de l'uréase d'*Helicobacter*.
9. Une composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle l'agent immunogène est dérivé d'*Helicobacter pylori*.
10. L'usage d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins un composé sélectionné parmi :
 - (i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;
 - (ii) des lipides cationiques qui sont des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et ont une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires ; et
 - (iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 11.
- R^1 représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,
- X représente $-CH_2-$, $-O-$ ou $-NH-$,
- R^2 représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,
- R^3 , R^4 et R^5 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl-CO- R^6 , dans lequel R^6 représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,
- R^7 représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C_1-C_7 , hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle, carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-imidazolylméthyle,
- R^8 représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- R^9 représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et
- R^7 et R^8 peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe $-CH_2-CH_2-CH_2-$;
- dans la fabrication d'une composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*.
11. L'usage selon la revendication 10, d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins deux composés ; un premier composé étant sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et un deuxième composé étant sélectionné parmi des lipides

- 5 cationiques qui sont des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et ont une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.
- 10 12. L'usage selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le composé est une saponine qui est la fraction QS-21 purifiée à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria*.
13. L'usage selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le composé est un lipide cationique mis sous forme de liposome.
- 15 14. L'usage selon la revendication 10, 11 ou 13, dans lequel le composé est le 3 bêta -(N-(N',N'-diméthyl aminoéthane)-carbamoyl) cholestérol (DC-chol).
- 20 15. L'usage selon la revendication 10, dans lequel le composé est un glycolipopeptide qui est le N-(2-L-leucinamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-N-octadécyl-dodécanylamide (Bay R1005).
- 25 16. L'usage selon l'une des revendications 10 à 15, dans lequel la réponse immunitaire de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée soit (i) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 100 ou (ii) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgA supérieur ou égal à 1 : 100.
- 30 17. L'usage selon la revendication 16, dans lequel la réponse immunitaire de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée soit (i) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 10 ou (ii) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgA supérieur ou égal à 1 : 10.
- 35 18. L'usage selon la revendication 17, dans lequel la réponse immunitaire de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée soit (i) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 2 ou (ii) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgA supérieur ou égal à 1 : 2.

19. L'usage selon l'une des revendications 10 à 18, dans lequel l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.
- 5
20. L'usage selon la revendication 19, dans lequel l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est la sous-unité UreB ou UreA de l'uréase d'*Helicobacter*.
21. L'usage selon l'une des revendications 10 à 20, dans lequel l'agent immunogène est dérivé d'*Helicobacter pylori*.
- 10
22. L'usage selon l'une des revendications 10 à 21, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique.
23. L'usage selon la revendication 22, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique stricte.
- 15
24. L'usage selon la revendication 22 ou 23, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique dans la partie d'un mammifère, notamment d'un primate située sous son diaphragme.
- 20
25. L'usage selon l'une des revendications 22 à 24, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique dans la région dorso-lombaire d'un mammifère, notamment d'un primate.
- 25
26. L'usage selon l'une des revendications 22 à 25, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par une voie systémique sélectionnée parmi la voie sous-cutanée, la voie intramusculaire et la voie intradermique.
- 30
27. L'usage selon l'une des revendications 10 à 26, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée deux ou trois fois par voie systémique au cours d'un même traitement, afin de prévenir ou de traiter une infection à *Helicobacter*.
- 35
28. L'usage conjoint d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-

helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*, dans la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée par voie systémique pour prévenir ou traiter une infection à *Helicobacter*.

Figure 1

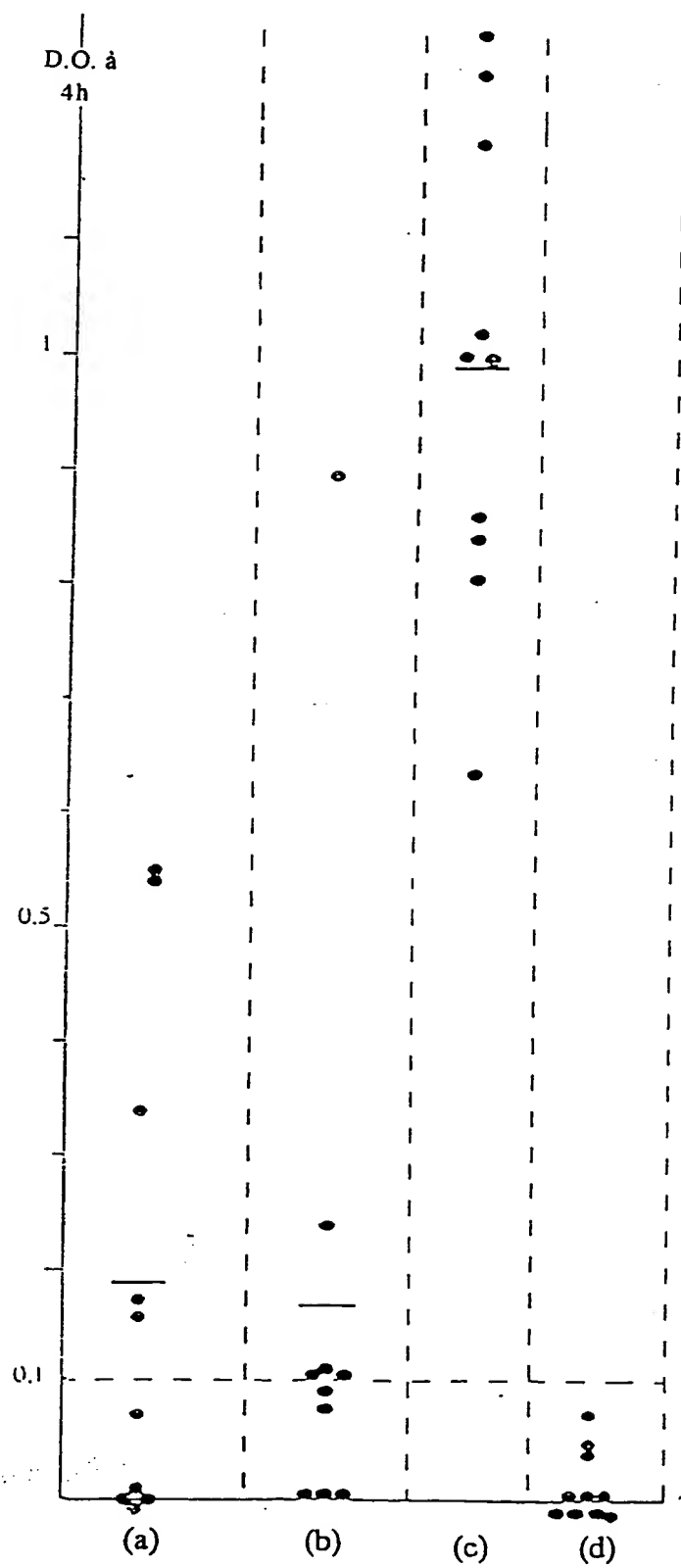


Figure 2

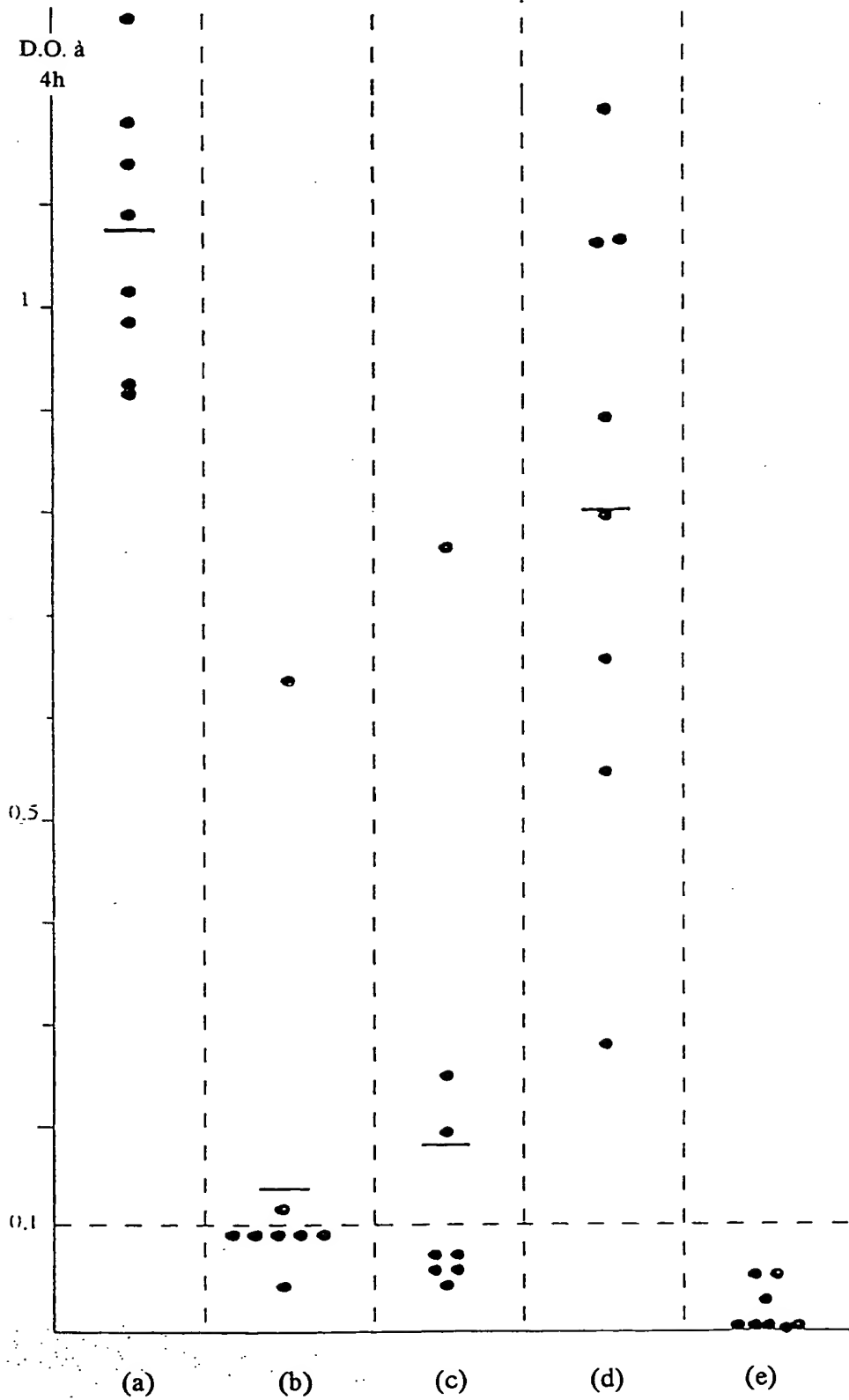


Figure 3

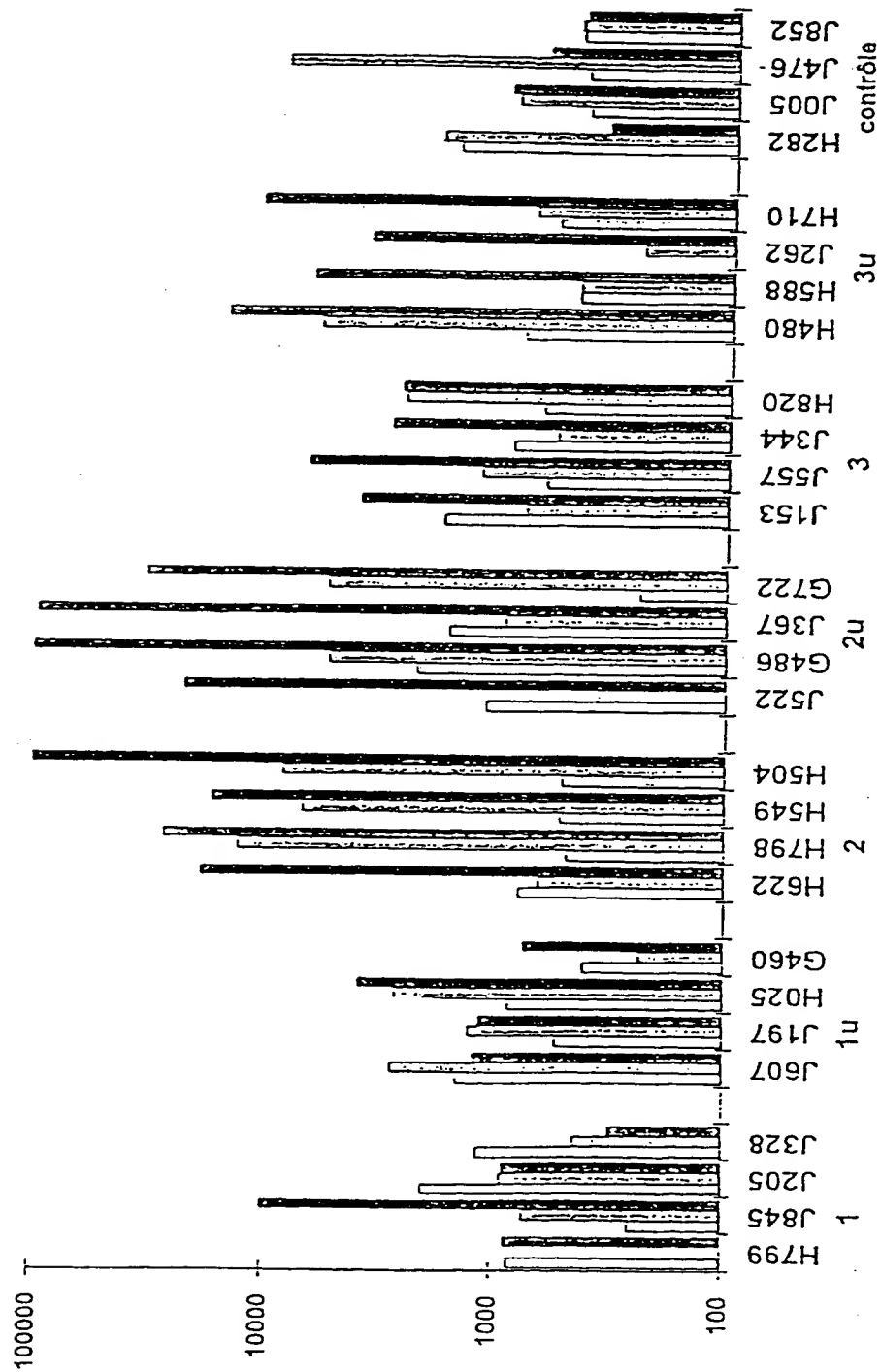


Figure 4

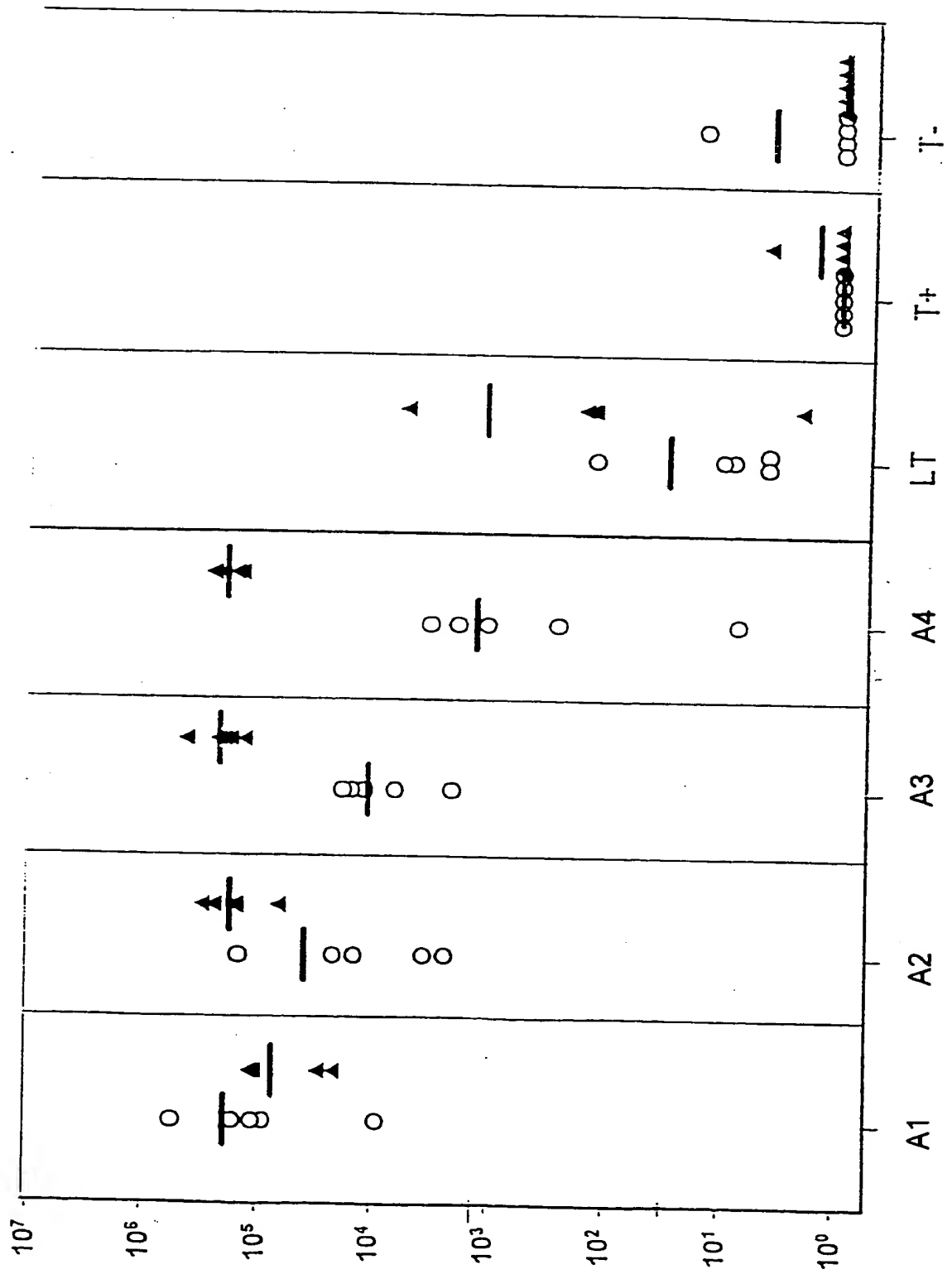


Figure 5

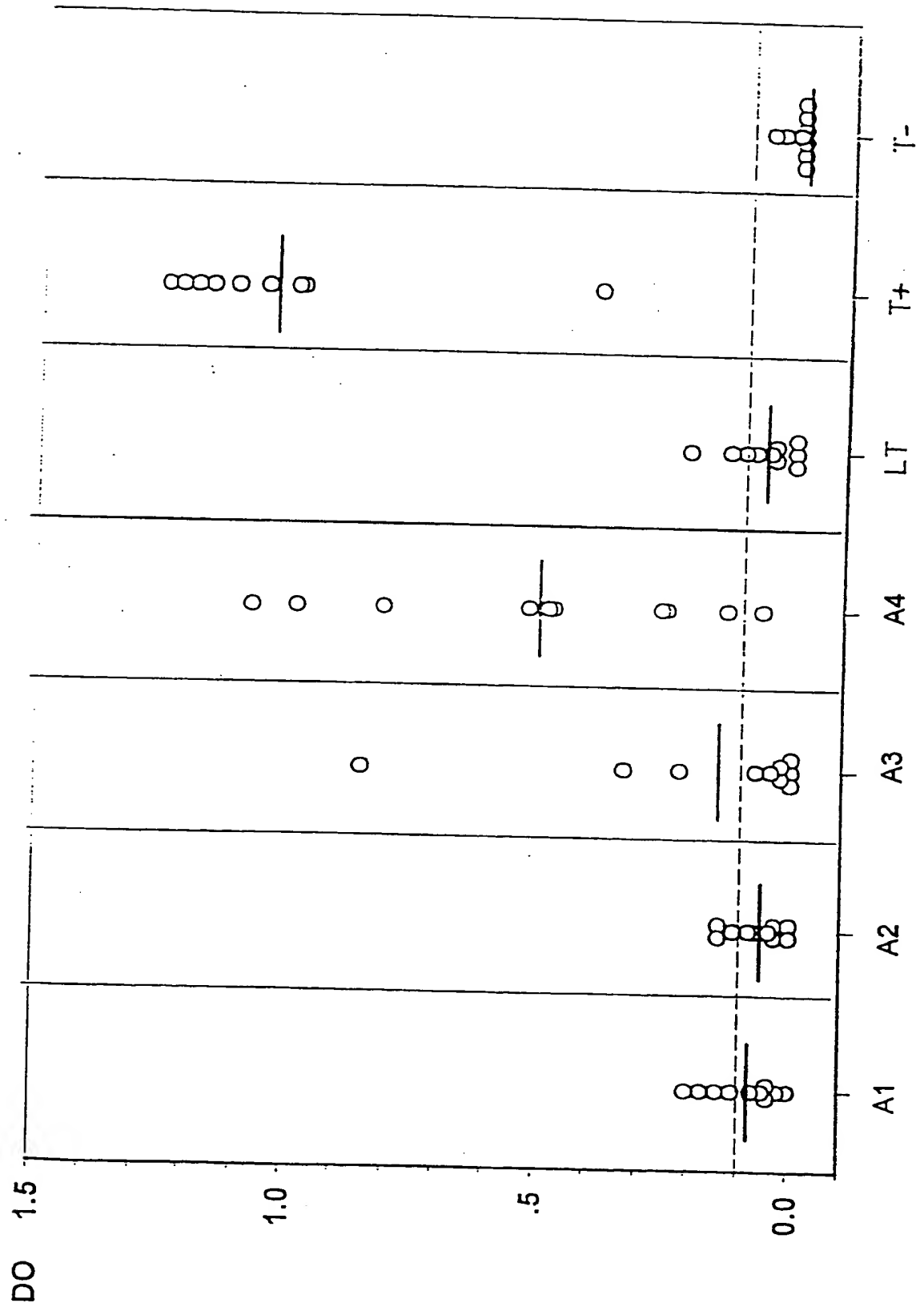
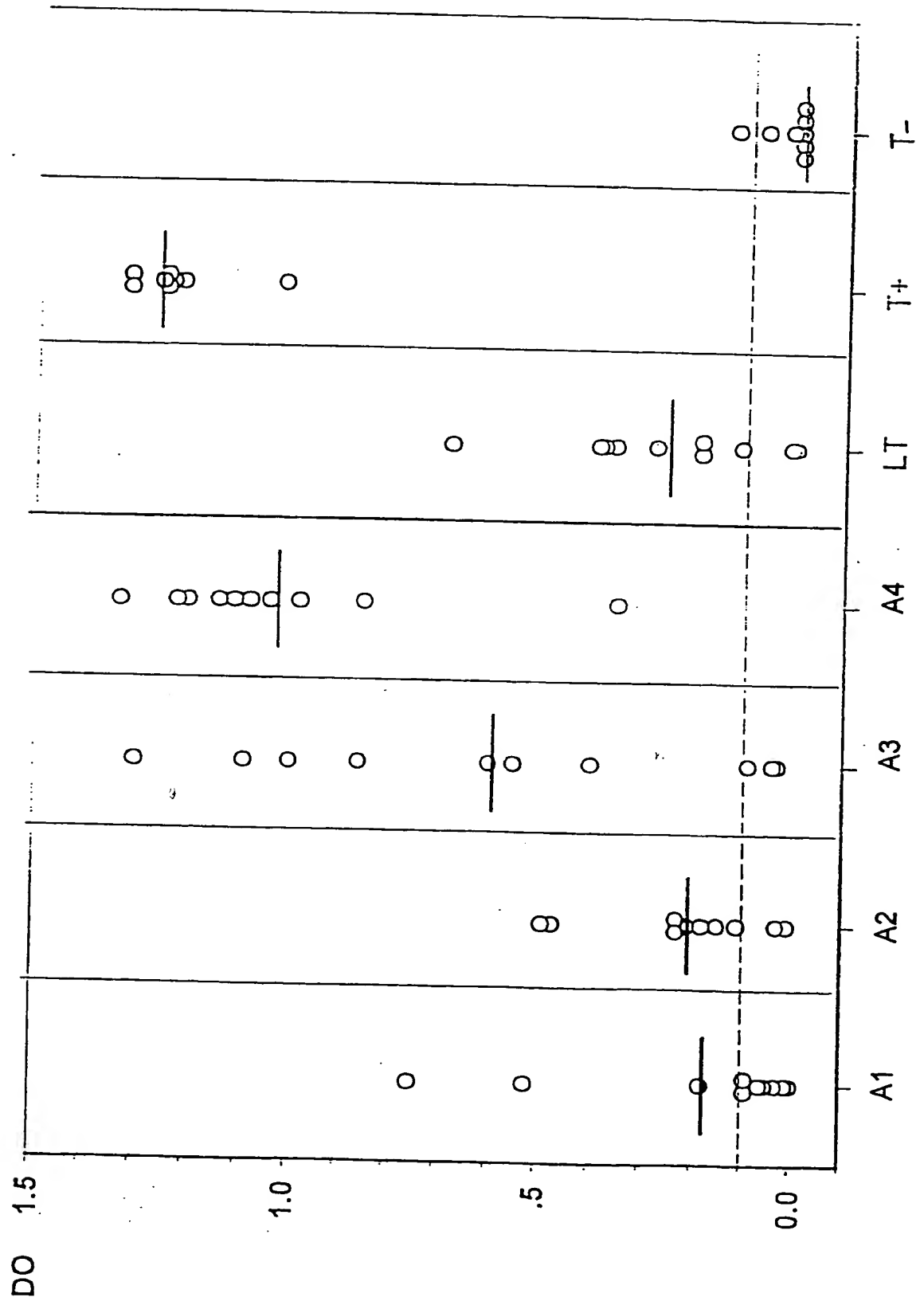


Figure 6

514 Rec'd PCTP TO NOV 1999

THIS PAGE IS UNCLASSIFIED

514 Rec'd PCT/PTO NOV 1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)